

施された。検体は匿名化され、個人情報と切り離された形で研究に提供された。

C.研究結果

(1) 末梢血 CD3 陽性 T 細胞では未刺激下でも IL-32 発現がみられ、Con A, α CD3/ α CD28 Abs 刺激により発現増強がみられた。CD14 陽性細胞, CD20 陽性細胞は未刺激では IL-32 を発現せず、刺激により発現がみられた。しかし CD3 陽性細胞非存在下では IL-32 発現が著しく減少した。CD8 陽性 T 細胞はサイトカイン刺激に対して有意な IL-32 発現増加を示さなかったが、CD4 陽性細胞は、IL-23, IL-12+IL-18, TNF- α の刺激により IL-32 発現が増加した。

(2) 各臓器における IL-32 の発現を定量的 PCR により検討すると、脾臓・肺・単核球・多核球において発現が見られた。

(3) RA 患者の滑膜組織では OA 患者と比較して RT-PCR で IL-32 発現が著しく亢進していた。In situ hybridization では RA 患者の滑膜に浸潤するリンパ球に IL-32 の発現亢進がみられた。

(4) CIA マウスにおいて、関節炎発症直前に IL-32 β 導入 CD4 陽性 T 細胞を移入すると、関節炎の発症が早まり、関節炎スコアも有意に上昇した。可溶性 TNF レセプター (エンブレル) を投与すると、IL-32 β 導入 CD4 陽性 T 細胞移入による関節炎の増悪効果は減弱した。

(5) IL-32 β 骨髄キメラマウスでは、脾臓において TNF- α ・IL-1 β の発現が亢進しており、特に脾臓 F4/80 マクロファージにおいて TNF- α ・IL-1 β の発現が亢進していた。血清中に高濃度の TNF- α が検出された。IL-32 β 骨髄キメラマウスに抗 II 型コラーゲン抗体を投与して関節炎を誘導すると、IL-32 β 骨髄キメラマウスで明らかな増悪が認められた。また IL-32 β 骨髄キメラマウスにおいてトリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) による腸炎を誘導すると、明らかな増悪傾向を認めた。

D.考察

IL-32 は T 細胞, B 細胞, 単球で、特に刺激下

に発現していた。CD3 陽性 T 細胞除去により B 細胞, 単球で発現が減少することより、これらの細胞における IL-32 発現には T 細胞の関与が考えられた。また関節炎に関与することが知られている各種サイトカインの刺激により CD4 陽性 T 細胞で IL-32 発現が亢進することから、CD4 陽性 T 細胞は関節炎の病態において、IL-32 の重要な産生元であると考えられた。RA 患者の滑膜組織で IL-32 発現が亢進し、*in situ* hybridization では主に滑膜に浸潤するリンパ球で IL-32 発現が亢進していたこともこれを支持する。IL-32 β を導入した CD4 陽性細胞がマウス関節炎モデルを有意に増悪させたことより、IL-32 β の関節炎増悪効果が考えられた。また骨髄移植による IL-32 β 大量発現モデルでのサイトカイン発現の検討より、マクロファージにおける TNF- α , IL-1 β 発現の誘導が関節炎増悪の機序であると考えられた。また関節炎以外の炎症性疾患においても IL-32 の関与が考えられた。

E.結論

IL-32 は炎症性関節炎の重要なメディエーターのひとつであり、RA の病態形成に関与していると考えられた。IL-32 は RA 治療の新たなターゲットとなりうる。

F.健康危険情報

特記すべきことなし

G.研究発表

1.論文発表

- 1) Shoda H, Fujio K, Yamaguchi Y, Okamoto A, Sawada T, Kochi Y, Yamamoto K. Interactions between IL-32 and tumor necrosis factor alpha contribute to the exacerbation of immune-inflammatory diseases. *Arthritis Res Ther*. 2006;8(6):R166.
- 2) Fujio K, Okamoto A, Araki Y, Shoda H, Tahara H, Tsuno NH, Takahashi K, Kitamura T, Yamamoto K. Gene therapy of arthritis with TCR isolated from the inflamed paw. *J Immunol*.

2006 ;177(11):8140-8147.

3) Yamamoto K, Okamoto A, Fujio K. Antigen-specific immunotherapy for autoimmune diseases. Expert Opin. Biol. Ther. 2007; in press.

4) Fujio K, Okamura T, Okamoto A, Yamamoto K. T cell receptor gene therapy for autoimmune disease. Ann N Y Acad Sci. 2007; in press.

2.学会発表

1) Shoda H, Fujio K, Yamaguchi Y, Okamoto A, Sawada T, Kochi Y, Yamamoto K. IL-32 is closely associated with TNF-alpha and contributes to the exacerbation of inflammatory arthritis. Modern Rheumatology 2005,16 supplement: 108.

2) Shoda H, Fujio K, Yamaguchi Y, Okamoto A, Sawada T, Kochi Y, Yamamoto K. IL-32 is closely associated with TNF-alpha and contributes to the exacerbation of inflammatory arthritis.

Autoimmunity Reviews 2006, Abstracts of 5th international congress on autoimmunity:201

H.知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む)

1.特許取得

なし

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし

厚生労働科学研究費補助金(免疫・アレルギー疾患予防・治療研究事業)
分担研究報告書

多発性筋炎に対する免疫抑制療法等先端的新規治療法に関する研究

分担研究者 上阪 等 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科膠原病・リウマチ内科学 助教授
研究協力者 杉原毅彦 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科膠原病・リウマチ内科学 医員
沖山奈緒子 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科皮膚科学 大学院生

研究要旨 【目的】我々が新規開発した、多発性筋炎 (PM) のモデルマウスであるCタンパク誘導性筋炎 (CIM) の特性を解析し、PMの新治療法を開発する。1)既に臨床使用可能な生物学的製剤が標的とするサイトカインの遺伝子欠損マウスを用いて、CIM発症におけるそれぞれの重要性を検討しつつ、これらを標的とする各製剤マウス代用体による治療を試みる。2)CIMの発症と自然寛解における獲得並びに自然免疫系の関与を検討する。【方法】1)昨年度検討したIL1 α β ノックアウト(KO)、TNF α KOマウスに加えて、IL6KOマウスに組換えCタンパクフラグメント(fr2)を免疫して21日後の筋組織病理所見を観察する。野生型マウスにCIMを誘導する際、免疫前ないし免疫後からIL1受容体アンタゴニスト (anakinra surrogate)、抗TNF α 抗体 (infliximab surrogate)、抗IL6受容体抗体 (tocilizumab surrogate)を投与して筋組織を観察する。2)CIMマウスの大腿筋所属リンパ節細胞を非免疫マウスに養子移入して、被移入マウスの筋組織を観察する。また、CIMマウスリンパ球のfr2およびCタンパク内非免疫部分に対する反応性を、これらの抗原刺激による3Hサイミジン取り込みやIFN γ 産生を測定して検討する。さらに、筋炎自然消退後に再免疫することにより、免疫寛容の有無を検討する。【結果】1)IL1 α β KOマウスと同様にIL6KOマウスもCIMに抵抗性であった。IL1受容体アンタゴニストばかりでなく抗TNF α 抗体や抗IL6受容体抗体もCIMを改善させた。2)CIMマウスからの養子リンパ球移入で健常マウスに筋炎が発症し、この際、CD4T細胞よりCD8T細胞分画が強く筋炎を起した。しかし、筋炎発症には被移入マウス肢をCFA処理することが必要であった。In vitro反応では、Cタンパク内非免疫部分にもT細胞反応が認められた。自然寛解後に、再度のfr2/CFAの免疫でも、CFA処理だけでも、筋炎再燃が認められた。【結論】1)IL1、TNF α 、IL6阻害剤ともに筋炎治療に有用と考える根拠が得られた。また、CIM筋炎惹起は主にCD8T細胞が担う。免疫後、内因性筋抗原により自己免疫T細胞反応は拡大するにもかかわらず、筋炎は自然消退する。CFA再投与で再燃すること、およびT細胞養子移入による筋炎発症にCFA局所投与が必須であることは、筋炎顕在化には、末梢での自己反応性T細胞の存在と筋組織の自然免疫活性化の双方が必要であることを示す。これは、多発性筋炎で筋炎が限局性多発性に起きること、および寛解後も筋傷害性CD8T細胞クローンが末梢血に拡大したまま残るといふ我々の観察とも合致し、PMの病態解析や、新たな治療法の開発に道を開くものである。

A.研究目的

特定疾患の一つ多発性筋炎(PM)は原因不明の炎症性筋疾患で、非特異的な免疫抑制療法が行われてきた。しかし、副作用顕在化や治療抵抗性の症例も認められ、PMの病態に合わせたより選択的な治療法の開発が望まれる。我々が新たに開発しえた多発性筋炎 (PM) マウ

ス実験モデルである C タンパク誘導性筋炎 (CIM) は、ミオシン粗精製物中の骨格筋 C 蛋白を主要抗原とし、ヒト PM で想定しているのと同様に、細胞障害性 CD8T 細胞による筋傷害が筋炎の病態に重要であるという特性を持っており、PM に対する新規治療法の開発に寄与するモデルであることを昨年報告した。

そこで今年度は、既に臨床使用可能な生物学的製剤が標的とするサイトカインの遺伝子を欠損するマウスを用いて、CIM 発症における各サイトカインの重要性を検討する。また、各製剤マウス代用体による治療を試み、これらを治療標的とすることの妥当性を検討する。

また、PM の病態解析へ向け、CIM の発症と自然寛解における獲得並びに自然免疫系の関与を検討する。

B.研究方法

1)昨年度、検討した IL1 α β ノックアウト (KO)、TNF α KO マウスに加えて、IL6KO マウスに組換え C タンパクのフラグメント (fr2) を免疫して 21 日後に筋組織病理所見を観察する。野生型マウスに CIM を誘導する際、免疫前ないし免疫後から IL1 受容体アンタゴニスト IL1ra (anakinra surrogate)、抗 TNF α 抗体 (infliximab surrogate)、抗 IL6 受容体抗体 (tocilizumab surrogate) を投与して筋組織を観察する。

2)筋炎惹起性 T 細胞解析のために、CIM マウスの大腿筋所属リンパ節細胞を、樹状細胞(DC)、fr2 と共培養後、非免疫マウスに養子移入して、被移入マウスの筋炎を観察する。また、CIM マウスリンパ球の fr2 および C タンパク内非免疫部分(fr4)に対する反応性を、これらの抗原で刺激した時の 3H サイメジン取り込みと IFN γ 産生量を測定して検討する。さらに、筋炎自然消退後に再免疫することにより、免疫寛容の有無を検討する。

(倫理面への配慮)

本研究では、ヒト検体は用いなかった。動物実験に関しては、研究機関の動物実験基本指針に従い、動物福祉の観点からも適切な処置を行った。

C.研究結果

1)TNF α KO マウスは CIM に感受性であったが、IL1 α β KO マウスと同様に IL6KO マウスも CIM に抵抗性であった。抗サイトカイン療法では、IL1 受容体アンタゴ

ニストばかりでなく、抗 TNF α 抗体のマウス代用体も CIM を改善させた。抗 IL6 受容体抗体では、筋炎発症後の CIM マウスも治療することが出来た。

2)CIM マウスからの養子リンパ球移入で健常マウスに筋炎を移入できた。しかし、細胞移入だけでは筋炎は発症せず、被移入マウス肢を CFA 処理することが必要であった。また、CD8T 細胞分画と CD4T 細胞分画に分けて移入したところ、CD8T 細胞分画の方が、確実に筋炎を起した。

In vitro 反応では、C タンパク内非免疫部分 (Fr4)刺激でも、免疫部分(fr2)に対するのと同程度の、T 細胞のサイメジン取り込みや IFN γ 産生が認められた。

自然寛解後に、再度、fr2/CFA を免疫すると筋炎再燃が強く認められた。また、この時に、CFA 処理をするだけでも筋炎の再燃が認められた。

D.考察

1)IL1、TNF α 、IL6 阻害剤すべて筋炎治療に有用と考える根拠が得られた。TNF α KO マウスは CIM 感受性であることから、この KO マウスでは代償機構が作用しているか、抗 TNF α 抗体の効果が、膜型 TNF α 表出細胞を傷害して発現した可能性がある。

2)CD4T 細胞も、fr2 刺激によるサイメジン取り込みや IFN γ 産生といった細胞免疫反応を示しているが、CIM の筋炎惹起は主に CD8T 細胞が担う。

免疫後、内因性筋抗原によると思われる自己免疫 T 細胞反応は拡大するにもかかわらず、筋炎は自然消退する。ただし、自然消退後も、免疫寛容にはなっていない上に、CFA 再投与だけで再燃する。この現象と、T 細胞養子移入による筋炎発症には CFA 局所投与が必須であることはともに、筋炎顕在化には自然免疫活性化が必須であることを示す。1)で検討した抗サイトカイン療法で標的としたのも、自然免疫活性化に重要な役割を持つサイトカインであり、少な

くとも抗サイトカイン療法の効果の一部は、大腿筋局所での自然免疫の不活性化による、筋炎惹起性 T 細胞の遊走抑制であると考えられる。

E. 結論

PM で指摘されているのと同様に、CD8T 細胞が惹起すると考えられる CIM モデルマウスで、PM の抗サイトカイン療法の是非を検討した。筋炎治療薬として、IL1 受容体アンタゴニストや抗 TNF α 抗体、抗 IL6 受容体抗体投与は有望であるが、可溶性 TNF 受容体の効果は未だ予測できない。

一方で、CIM 発症には、末梢での自己反応性 T 細胞の存在と筋組織の自然免疫活性化の双方が必要であることが分かった。PM では、同一個体の中で、筋炎が限局性多発性に起きるが、CIM で観察された事象から類推するに、これは、筋組織での自然免疫活性化という土壌の有無に左右されていると考えられる。実際に我々は、PM では、寛解後も筋傷害性 CD8T 細胞クローンが末梢血に拡大したまま残るということを観察している。

サイトカイン KO マウスで CIM に抵抗性であるのみならず、抗サイトカイン療法が、CIM 発症後からの投与でも有効であったことは、サイトカインが、筋炎を惹起する自己反応性 T 細胞の誘導に必要なだけでなく、筋組織での自然免疫活性化を抑制し、自己反応性 T 細胞の遊走をとどめることにより、効果を発揮しているということが考えられる。

今後、CIM を用いて、自己免疫性筋炎の病態の解析を進め、さらに標的を絞った治療法の開発に結び付けていくことが期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

・ T Sugihara, C Sekine, T Nakae, K Kohyama, M Harigai, Y Iwakura, Y Matsumoto, N Miyasaka, and

H Kohsaka. A new murine model defines critical mediators in the pathology and treatment of polymyositis (Arthritis Rheum. in press).

2. 学会発表

1) Takahiko Sugihara, Chiyoko Sekine, Takashi Nakae, Mihoko Suzuki, Naoko Okiyama, Kuniko Kohyama, Masayoshi Harigai, Yoichiro Iwakura, Yoh Matsumoto, Nobuyuki Miyasaka, Hitoshi Kohsaka. A new murine model defines critical mediators in the pathology and treatment of polymyositis. 5th International Congress On Autoimmunity, Sorrento, Italy, December, 2006.

2) 杉原毅彦、関根知世子、針谷正祥、神山邦子、松本 陽、中江 孝、宮坂信之、上阪 等. 多発性筋炎の病態解析と新規治療法の開発に有用なモデルマウスの確立. 第 50 回日本リウマチ学会総会、長崎、2006 年 4 月.

3) 杉原毅彦、関根知世子、針谷正祥、神山邦子、松本 陽、宮坂信之、上阪 等. 多発性筋炎の病態解析と新規治療法の開発に有用なモデルマウスの確立. 第 35 回日本免疫学会総会、大阪、2006 年 12 月.

4) N. Okiyama, T. Sugihara, H. Yokozeki, N. Miyasaka, H. Kohsaka; A new mouse model of polymyositis indicates IL-6 as a therapeutic target. Keystone Symposia, New Mexico, USA, March, 2007

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む)

1. 特許取得

2006 年 12 月 27 日出願

IL-6 アンタゴニストを有効成分とすることを特徴とする炎症性筋疾患治療剤

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

厚生労働科学研究費補助金(免疫・アレルギー疾患予防・治療研究事業)
分担研究報告書

病原性 T 細胞のサイトカイン産生制御機構に関する研究

分担研究者 山村 隆 国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部 部長
研究協力者 大木 伸司 国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部 室長

研究要旨

多発性硬化症(Multiple Sclerosis: MS)では Th1 細胞や Th17 細胞が脳炎の誘導において重要な役割を果たす。我々は近年、MS 患者末梢血 T 細胞の遺伝子発現を DNA マイクロアレイにより解析し、MS で健常者に比較して発現亢進する遺伝子群を同定している。今回その中で最も有意な発現差異を認めた分子 NR4A2 に着目し、病態との関連を解析した。まず MS の動物モデル実験的自己免疫性脳脊髄炎 (EAE) を発症したマウスの中枢神経浸潤 T 細胞で、NR4A2 が選択的に発現亢進していることを確認した。つぎに T 細胞株を用いたリポーターアッセイとレトロウイルスを用いた遺伝子導入実験により、NR4A2 が IL-17、IFN- γ 、IL-2 等のサイトカイン産生を増強することを示した。一方、ヒト末梢血由来 CD4+T 細胞に NR4A2 の siRNA を導入することにより、抗 CD3 抗体刺激後のサイトカイン産生は抑制された。以上の結果は、NR4A2 が炎症性サイトカイン産生の鍵を握る転写因子であることを示し、同分子を標的とする新しい治療法の開発が期待される。

A.研究目的

これまで多発性硬化症(Multiple Sclerosis: MS)患者由来末梢血 T 細胞において、健常人に比して発現亢進する遺伝子群を、DNA マイクロアレイを用いて解析し報告してきた。今回その中で最も有意な発現差異を認めた分子 NR4A2 に着目し、病態との関連を解析した。NR4A2 は、Steroid thyroid hormone receptor superfamily に属するオーファン核内受容体で、さまざまな生体応答に関わる分子である。今回我々は、T 細胞における NR4A2 の機能を、病態との関連に焦点を絞って解析した。

B.研究方法

DNA マイクロアレイの結果を検証するため、MS 末梢血 T 細胞と健常人末梢血 T 細胞における NR4A2 の遺伝子発現を、定量 PCR 法を用いて比較検討した。C57BL/6 マウスに MOG₃₅₋₅₅ ペプチドを免疫することにより、実験的自己免疫性脳脊髄炎

(Experimental Autoimmune Encephalomyelitis: EAE) を誘導した。脳脊髄(CNS)浸潤細胞、所属リンパ節細胞、脾臓細胞をそれぞれ調製し、CD3 マイクロビーズを用いて分離した T 細胞から RNA を分離した。逆転写後、定量 PCR 法を用いて NR4A2 の発現レベルを定量解析した。CNS 浸潤 T 細胞からのサイトカイン産生を、ELISA 法ならびに細胞内サイトカイン染色法を用いて解析した。T 細胞株に、NR4A2 発現プラスミドと、サイトカイン (IL-17、IFN- γ 、IL-2) のレポーター遺伝子を導入し、ルシフェラーゼアッセイを行った。レトロウイルスベクターを用いて、ヒト末梢血 CD4 T 細胞に NR4A2 分子を過剰発現させ、抗 CD3 抗体刺激後のサイトカイン産生を細胞内サイトカイン染色法により解析した。同様に、ヒト末梢血 CD4 T 細胞に、NR4A2 の siRNA を導入し、抗 CD3 抗体刺激後のサイトカイン産生を、ELISA 法にて定量した。

(倫理面への配慮)

採血に当たっては、ドナーに対して十分な説明を行った後、書面により同意を確認して行った。また個人情報保護についても十分な配慮を払った。動物実験に関しては、当研究所の動物実験規定に従い、実験計画書の承認を受けて行った。

C. 研究結果

はじめに、DNA マイクロアレイ解析で得られたデータを再検証するため、MS 患者由来末梢血 T 細胞と、健康人末梢血 T 細胞における NR4A2 の発現を定量 PCR 法を用いて検討した結果、健康人と比して MS 患者で有意な発現亢進（約 5 倍）を確認した。次に、C57BL/6 マウスに MOG₃₅₋₅₅ ペプチドを免疫することにより EAE を誘導した。脳脊髄(CNS)浸潤細胞、所属リンパ節細胞、脾臓細胞から T 細胞を分離し、得られた RNA を元に定量 PCR を用いて NR4A2 の発現レベルを比較した結果、CNS 浸潤 T 細胞のみで、病勢に相関した選択的な NR4A2 の発現亢進を認めた。この CNS 浸潤 T 細胞における再刺激後のサイトカイン産生を調べると、細胞内染色法による検討では、約 30%の細胞が IL-17 を産生しており、CNS への顕著な IL-17 産生細胞の浸潤を認めた。IL-17 は EAE 発症に重要なサイトカインであることから、NR4A2 の IL-17 産生に与える影響についてさらに検討を加えた。T 細胞株を用いてルシフェラーゼアッセイを行うと、NR4A 発現プラスミドの導入により、IL-17、IFN- γ 、IL-2 の産生が増強した。レトロウイルスベクターを用いて、ヒト末梢血 CD4 T 細胞に NR4A2 分子を過剰発現させると、IL-17 および IFN- γ 産生の選択的な亢進が認められた。ヒト末梢血 CD4 T 細胞に、NR4A2 の siRNA を導入してその発現を選択的に抑制すると、抗 CD3 抗体刺激後の IL-17、IFN- γ 、IL-2 の産生は、いずれも有意に抑制された。

D. 考察

DNA マイクロアレイ解析により、MS 患者末梢血で遺伝子発現の亢進を認めた NR4A2 は、MS のマウスモデルである EAE においては、CNS 浸潤 T 細胞に選択的な発現の亢進が認められた。

CNS に浸潤した T 細胞は、病態に深く関わるサイトカインである IL-17 を特異的に発現したこと、NR4A2 の有無が T 細胞からの IL-17 産生に影響を与えることなどから、NR4A2 は IL-17 の産生制御を介して MS の病態に深く関わる分子である可能性が示された。NR4A2 の EAE の病態に与える影響については、今後 siRNA を介した IL-17 産生抑制と併せて検討していく予定である。また、今後 NR4A2 の機能修飾を指標とした小分子化合物のスクリーニングを通じて、MSをはじめとする種々の自己免疫疾患に対する NR4A2 をターゲットとした新規治療法の開発につながる結果が得られたと考えている。

E. 結論

MS 患者における選択的な NR4A2 発現亢進と、T 細胞の IL-17 産生制御能から、NR4A2 が MSをはじめとする種々の自己免疫疾患の新規治療ターゲット分子となりうる可能性が示された。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

原著

- 1) Pyz E, Naidenko O, Miyake S, Yamamura T, Berberich I, Cardell S, Kronenberg M, Herrmann T. The complementarity determining region 2 of BV8S2 (V beta 8.2) contributes to antigen recognition by rat invariant NKT cell TCR. *J. Immunol.* 176(12): 7447-7455, 2006
- 2) Miyamoto K, Miyake S, Mizuno M, Oka N, Kusunoki S and Yamamura T. Selective COX-2 inhibitor celecoxib prevents experimental autoimmune encephalomyelitis through COX-2 independent pathway. *Brain* 129: 1984-1992, 2006
- 3) Croxford JL, Miyake S, Huang Y-Y, Shimamura M and Yamamura T. Invariant V α 19i T cells regulate autoimmune inflammation. *Nat. Immunol.* 7(9): 987-994, 2006

- 4) Aranami T, Miyake S and Yamamura T. Differential expression of CD11c by peripheral blood NK cells reflects temporal activity of multiple sclerosis. *J. Immunol.* 177(8): 5659-5667, 2006
- 5) Satoh J-i, Nakanishi M, Koike F, Onoue H, Aranami T, Yamamoto T, Kawai M, Kikuchi S, Nomura K, Yokoyama K, Ota K, Saito T, Ohta M, Miyake S, Kanda T, Fukazawa T and Yamamura T. T cell gene expression profiling identifies distinct subgroups of Japanese multiple sclerosis patients. *J. Neuroimmunol.* 174(1): 108-118, 2006
- 2.学会発表
国際学会
- 1) Sakuishi K, Aranami S, Miyake S, Yamamura T. IL-2 costimulates IL-5 production by CD1d-reactive human CD4+ NKT cells: a novel pathway controlling NKT cell-mediated Th2 response. Annual meeting of the American association of immunologists, Boston, May 14, 2006
- 2) Oki S, Yamamura T, Miyake S. Molecular mechanism of differential cytokine production by altered glycolipid ligand-stimulated natural killer T(NKT) cells. IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology & FAOBMB Congress, Kyoto, June 18-23, 2006
- 3) Kaieda S, Oki S, Yamamura T, Miyake S. New synthetic glycolipid ligands for NKT cells suppresses antibody-induced arthritis. 6th Annual Conference of FOCIS, San Francisco, June 2, 2006
- 4) Doi Y, Oki S, Satoh J-i, Aranami T, Miyake S, Yamamura T. NR4A2 (Nurr1), an orphan nuclear receptor, is overexpressed in peripheral blood T lymphocytes of multiple sclerosis. The 8th International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, Oct. 16-19, 2006 (*J. Neuroimmunology.* 178 S1, p78, 2006)
- 5) Croxford JL, Miyake S, Shimamura M, Yamamura T. Invariant V α 19-J α 33 NKT cells promote ICOS-dependent IL-10 production by B cells which regulated inflammation in a model of multiple sclerosis. The 8th International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, Oct. 16-19, 2006 (*J. Neuroimmunology.* 85 S1, p85, 2006)
- 6) Aranami T, Miyake S, Yamamura T. CD11c on NK cells mirrors the disease activity of multiple sclerosis. The 8th International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, Oct. 16-19, 2006 (*J. Neuroimmunology.* 178 S1, p102, 2006)
- 7) Miyamoto K, Miyake S, Kusunoki S, Yamamura T. Selective COX-2 inhibitor celecoxib prevents experimental autoimmune encephalomyelitis through COX-2 independent pathway. The 8th International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, Oct. 16-19, 2006 (*J. Neuroimmunology.* 117 S1, p117, 2006)
- 8) Sakuishi K, Miyake S, Yamamura T. Control of IL-5 production in CD1d-reactive human CD4+ NKT cell clones from MS patients following exogenous IL-2 co-stimulation. The 8th International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, Oct. 16-19, 2006 (*J. Neuroimmunology.* 147 S1, p102, 2006)
- 9) Oki S, Yamamura T, Miyake S. Natural killer T cell ligand OCH as a potential therapeutics for multiple sclerosis: Mechanism for OCH-induced TH2 polarization in vivo. The 8th International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, Oct. 16-19, 2006 (*J. Neuroimmunology.* 148 S1, p102, 2006)
- 10) Sato W, Aranami T, Yamamura T. CCR2 as a marker for human T cells producing IL-17. The 8th International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, Oct. 16-19, 2006 (*J. Neuroimmunology.* 148 S1, p102, 2006)
- 11) Lin Y, Miyake S, Yamamura T. Induction of adaptive regulatory T cells during recovery of

EAE sensitized with PLP136-150 in SJL/J mice: The presence of suppressor epitope within PLP. The 8th International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, Oct. 16-19, 2006 (J. Neuroimmunology. 151 S1, p102, 2006)

- 12) Nagayama S, Miyake S, Yamamura T. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by transfer of lymphokine-activated natural killer (NK) cells. The 8th International Conference of Neuroimmunology, Nagoya, Oct. 16-19, 2006 (J. Neuroimmunology. 169 S1, p102, 2006)
- 13) Kaieda S, Oki S, Yamamura T, Miyake S. Activation of natural killer T cells with synthetic glycolipid suppresses antibody-induced arthritis. American College of Rheumatology 70th Annual Scientific Meeting, Washington, DC, November 13, 2006 (Arthritis Rheum. 54: S358, 2006)

国内学会

- 1) Croxford JL, Miyake S, Shimamura M, Yamamura T: Invariant V α 19-J α 33 NKT cells promote ICOS-dependent IL-10 production by B cells which regulate inflammation in a model of multiple sclerosis. 第18回日本神経免疫学会学術集会、名古屋、3月2日、2006
- 2) 海江田信二郎、大木伸司、山村隆、三宅幸子：NKT細胞活性制御作用を介した新規合成等脂質によるマウスモデル関節炎の抑制 第50回日本リウマチ学会、長崎、4月24日、2006
- 3) 大塚敬男、三宅幸子、林幼偉、山村隆：実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)における Neuropeptide Y (NPY)の役割 第47回日本神経学会、東京、5月13日、2006
- 4) 作石かおり、三宅幸子、山村隆：IL-2を介したCD4陽性NKT細胞クローンにおけるTh2サイトカインの選択的産生 第36回日本免疫学会、大阪、12月11-13日、2006
- 5) Lin Y, Croxford JL, Miyake S, Yamamura T.

Induction of adaptive regulatory T cells expressing CD103 besides CD25 and Foxp3 during recovery of EAE. The presence of suppressor epitope within encephalitogenic peptide. 第36回日本免疫学会、大阪、12月11-13日、2006

- 6) Croxford JL, Miyake S, Shimamura M, Yamamura T. Invariant V α 19-J α 33 NKT cells promote ICOS-dependent IL-10 production by B cells which regulated inflammation in a model of multiple sclerosis. 第36回日本免疫学会、大阪、12月11-13日、2006
- 7) Doi Y, Oki S, Miyake S, Yamamura T. Functional analysis of NR4A2, an orphan nuclear receptor, on the development of autoimmune encephalomyelitis. 第36回日本免疫学会、大阪、12月11-13日、2006
- 8) Fujita M, Ootsuka T, Oki S, Mizuno M, Tomi C, Kaieda S, Miyake S, Yamamura T. Role of carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule 1 in experimental autoimmune encephalomyelitis. 第36回日本免疫学会、大阪、12月11-13日、2006
- 9) Tsukamoto K, Lin Q, Ohtsuji M, Nakamura K, Tsurui H, Miyake S, Yamamura T, Hirose S. Role of NKT cells in systemic lupus erythemaotus. 第36回日本免疫学会、大阪、12月11-13日、2006
- 10) 海江田信二郎、水野美歩、大木伸司、坂口志文、坂口敦子、山村隆、三宅幸子：SKGマウスにおける結核死菌投与による関節炎の誘導：第36回日本免疫学会、大阪、12月11-13日、2006
- 11) Sato W, Aranami T, Yamamura T. Human Th17 cells are identified as bearing CCR2+CCR5-phenotype. 第36回日本免疫学会、大阪、12月11-13日、2006
- 12) Satoh J-I, Kawai M, Tabunoki H, Kanda T, Yamamura T. Microarray analysis identifies CXCR3 ligand chemokines as immediate early IFN-responsive genes in peripheral blood

lymphocytes in vitro and in vivo. 第36回日本免疫学会、大阪、12月11-13日、2006

- 13) Aranami T, Sato W, Yamamura T. CD28- T cells in multiple sclerosis might be derived from distinct precursors. 第36回日本免疫学会、大阪、12月11-13日、2006

H.知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む)

1.特許取得

1) 発明の名称

IL-17産生抑制物質およびそのスクリーニング方法

発明者：大木伸司、三宅幸子、山村 隆 他一名

出願予定日：2007年2月28日

出願人：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

出願番号または公開番号：出願準備中のためなし

2) 発明の名称

IL-17に起因する炎症を改善するための医薬組成物

発明者：大木伸司、三宅幸子、山村 隆 他一名

出願予定日：2007年2月28日

出願人：財団法人ヒューマンサイエンス振興財団

出願番号または公開番号：出願準備中のためなし

2.実用新案登録

特になし

3.その他

特になし

厚生省労働研究補助金〔免疫・アレルギー疾患予防・治療研究事業〕
分担研究報告書

制御性 T 細胞を用いた自己免疫の抑制に関する研究

分担研究者氏名 坂口 志文 京都大学再生医科学研究所 教授

研究要旨

マウスを用いて、CD25+CD4+制御性 T 細胞による免疫制御に関与する分子、およびその遺伝子を探索・同定する目的で、転写因子 Foxp3 の作用機序を解析した。その結果、Foxp3 は、別の転写因子 AML1 と結合し、その作用を発揮するとの結果を得た。Foxp3 と AML1 との結合阻害は、制御性 T 細胞機能を減弱させた。Foxp3/Runx1 の操作は、免疫病治療へ応用可能と考える。

A.研究目的

正常個体中には、CD4+T細胞の約10%を占める制御性T細胞が存在する。このT細胞群は、CD25分子および転写因子Foxp3を恒常的に発現する。その異常は自己免疫病の原因となる。一方、この内在性制御性T細胞の強化により自己免疫病の治療・予防が可能である。本分担研究では、内在性制御性T細胞の分子マーカーの検索と制御性T細胞の抑制機能の分子的基础の解明、それを用いた自己免疫反応の制御を目的とする。

B.研究方法

転写因子Foxp3は、制御性T細胞の発生、機能のマスター制御遺伝子である。Foxp3が分子レベルで、如何に他の遺伝子を制御するかを知るため、yeast-two-hybrid法を用いて、Foxp3と結合する蛋白を探索した。候補蛋白を同定し、そのFoxp3との結合性、その変異が制御性T細胞機能に及ぼす影響を解析した。

C.研究結果

Foxp3に結合する蛋白として転写因子AML1 (Acute myeloid leukemia 1) (別名Runx1)を見いだした。正常T細胞では、

AML1はIL-2 promoter中のAML1共通結合シーケンス(ACCACA)に結合し、IL-2産生を亢進させた。ヒト末梢血T細胞について、siRNAによるAML1 knockdownによりIL-2産生は阻害された。正常ヒト末梢血リンパ球の抗Foxp3抗体による免疫沈降反応で、AML1が共沈した。Foxp3/AML1は、GST-pulldownにより物理的会合を示した。ヒト制御性T細胞におけるAML1 knockdownにより抑制機能が解除された。さらに、Foxp3のAML1結合部位に変異を導入することで、Foxp3/AML1結合を低下させると、その低下度に応じて、制御性T細胞の抑制機能も低下した。

D.考察

Foxp3による制御性T細胞機能の発現には、Foxp3とAML1との結合が必須である。その結合異常は、制御性T細胞機能を低下させる。ヒトの自己免疫疾患で、AML1およびAML1-結合部位のSNP多型性との相関が知られている。相関の機序として、AML1がIL-2産生制御および制御性T細胞機能に関与するため、AML1の異常の結果、制御性T細胞異常が生じ、制御性T細胞機能異常につながる可能性が示唆された。

E. 結論

ヒトでもマウスでも、転写因子 Foxp3 は、転写因子 AML1 と結合することで、その機能を発揮する。AML1 の遺伝的異常は、制御性 T 細胞の発生、機能の異常をもたらす、自己免疫病の原因となりうる。また、この相互作用を操作し制御性 T 細胞機能を強化することによる新しい免疫制御法は、将来的に、自己免疫病を含む様々な免疫疾患の治療法となりうる。

F. 健康危険情報

該当せず。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Cobb BS, Hertweck A, Smith J, O'connor E, Graf D, Cook T, Smale ST, Sakaguchi S, Livesey FJ, Fisher AG, Merckenschlager M.: A role for Dicer in immune regulation. *J Exp Med.* 203:2519-2527, 2006.
- 2) Yamaguchi T, Sakaguchi S.: Skin controls immune regulators. *Nat Med.* 12:1358-1359, 2006.
- 3) Katakai T, Nomura T, Gonda H, Sugai M, Agata Y, Nishio A, Masuda T, Sakaguchi S, Shimizu A.: Spontaneous Large-Scale Lymphoid Neogenesis and Balanced Autoimmunity versus Tolerance in the Stomach of H+/K+-ATPase-Reactive TCR Transgenic Mouse. *J Immunol.* 177(11):7858-67, 2006.
- 4) Bodor J, Fehervari Z, Diamond B, Sakaguchi S.: Regulatory T cell-mediated suppression: potential role of ICER. *J Leukoc Biol.* 2006
- 5) Lee SK, Choi BK, Kim YH, Kang WJ, Kim KH, Sakaguchi S, Suh JH, Kim TY, Kwon BS.: Glucocorticoid-induced tumour necrosis factor receptor family-related receptor signalling exacerbates hapten-induced colitis by CD4+ T cells. *Immunology.* 119(4):479-87, 2006.
- 6) Nagahama, K., and Sakaguchi, S.: Preparation of regulatory T cells in vitro. In *Immunological Tolerance: Methods and Protocols*, edit. P. J. Fairchild, Humana Press, In press.
- 7) Matsubara Y, Hori T, Morita R, Sakaguchi S, Uchiyama T.: Delineation of immunoregulatory properties of adult T-cell leukemia cells. *Int. J. Hematol.* 84:63-69, 2006.
- 8) Kobayashi K, Suda T, Nan-Ya K, Sakaguchi N, Sakaguchi S, Miki I.: Cytokine production profile of splenocytes derived from zymosan A-treated SKG mice developing arthritis. *Inflamm Res.* 55:335-341, 2006.
- 9) Wing, K. and Sakaguchi, S.: Regulatory T cells in allergy. *Curr. Opin. Allergy and Immunol.* 6(6):482-8, 2006.
- 10) Sakaguchi, S.: Introduction: Regulatory T cells. *Springer Semin. Immunopathol.* 28(1):1-2, 2006.
- 11) Fehervari, Z. and Sakaguchi, S.: Peacekeepers of the immune system. *Scientific American.* 295:34-41, 2006.
- 12) Wing, K., Fehervari, Z., and Sakaguchi, S.: Emerging possibilities in the development and function of regulatory T cells. *Int. Immunol.* 18 : 991-1000, 2006
- 13) Sugimoto, N., Oida, T., Hirota, K., Nakamura, K., Nomura, T., Uchiyama, T., and Sakaguchi, S.: Foxp3-dependent and -independent molecules specific for CD25⁺CD4⁺ natural regulatory T cells revealed by DNA microarray analysis. *Int. Immunol.* 18 : 1197-1209, 2006
- 14) Nishioka, T., Shimizu, J, Iida, R., Yamazaki, S., and Sakaguchi, S.: CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T cells and CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ T cells in aged mice. *J. Immunol.* 176:6586-6593, 2006.
- 15) Ramirez-Montagut T, Chow A,

- Hirschhorn-Cymerman D, Terwey TH, Kochman AA, Lu S, Miles RC, Sakaguchi S, Houghton AN, van den Brink MR. Glucocorticoid-Induced TNF Receptor Family Related Gene Activation Overcomes Tolerance/Ignorance to Melanoma Differentiation Antigens and Enhances Antitumor Immunity. *J Immunol.* 176:6434-6442, 2006.
- 16) Sakaguchi, S.: Regulatory T cells: meden agan. *Immunol. Rev.* 212 : 5-7 ,2006.
- 17) Sakaguchi, S., Ono, M., Setoguchi, R., Haruhiko, Y., Hori, S., Fehervari, Z., Shimizu, J., Takahashi, T., and Nomura, T.: Fopx3⁺CD25⁺CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol. Rev.* 212:8-27,2006.
- 18) Cohen AD, Diab A, Perales MA, Wolchok JD, Rizzuto G, Merghoub T, Huggins D, Liu C, Turk MJ, Restifo NP, Sakaguchi S, Houghton AN. Agonist anti-GITR antibody enhances vaccine-induced CD8(+) T-cell responses and tumor immunity. *Cancer Res.* 66:4904-4912, 2006.
- 19) Kim, J., Choi, W. S, Kim, H. J., Suh, J-H., Sakaguchi, S., and Kwon B.: Conversion of alloantigen-specific CD8+ T-cell priming through in vitro ligation of glucocorticoid-induced TNF receptor. *J. Immunol.* 176:5223-5231, 2006.
- 20) Ono, M., Shimizu, J., Miyachi, Y., and Sakaguchi, S.: Control of Autoimmune Myocarditis and Multiorgan Inflammation by Glucocorticoid-Induced TNF Receptor Family-Related Protein^{high}, Fopx3-Expressing CD25⁺ and CD25⁻ Regulatory T cells. *J. Immunol.* 176:4748-4756.2006
- 21) Fehervari, Z., Yamaguchi, T., and Sakaguchi, S.: The dichotomous roles of IL-2: tolerance versus immunity. *Trends Immunol.* 27:109-111, 2006.
- 22) Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Yoshitomi, H., Hata, H., Takahashi, T., and Nomura, T.: Spontaneous development of autoimmune arthritis due to genetic anomaly of T cell signal transduction. *Semin. Immunol.* 18 : 199-206, 2006.
- 23) Yamaguchi, T. and Sakaguchi, S.: Regulatory T cells in immune surveillance and treatment of cancer. *Semin. Cancer Biol.* 16:115-123, 2006.
- 24) Sakaguchi, S., Takahashi, T., Hata, H., Yoshitomi, H., Tanaka, S., Hirota, K., Nomura, T., and Sakaguchi, N. SKG mice, a monogenic model of autoimmune arthritis due to altered signal transduction in T cells. In *The hereditary Basis of Rheumatic Diseases, Progress in Inflammation Research.* Edited by Rikard Holmdahl, Birkhaeuser Verlag, Basel, p147-159, 2006.
- 25) Sakaguchi, S., Setoguchi, R., Yagi, H., and Nomura, T.: Naturally arising Fopx3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in self-tolerance and autoimmune disease. *Curr Top Microbiol Immunol.* 305:51-66, 2006.
- 26) Fehervari, Z. and Sakaguchi, S.: T lymphocytes: Regulatory. *Nature Encyclopedia of Life Sciences.* Wiley Interscience, 2006. Available at www.els.net

2.学会発表

- 1) 畑 洋、中村孝志、塩沢俊一、三森経世、坂口教子、坂口志文：関節リウマチ(RA)患者における TCR シグナル遺伝子(ZAP-70 and CD3z chain)の遺伝子解析について 第 50 回日本リウマチ学会総会・学術集会 (2006. 4. 23-26 長崎)
- 2) 森元千晶、前田朋子、吉富啓之、藤井克樹、正木秀幸、坂田恒昭、鈴木隆二、坂口教子、坂口志文：SKG マウス関節炎由来 T 細胞クローン移入による関節炎・間質性肺炎の誘導 第 50 回 日本リウマチ学会総会・学術集会 (2006. 4. 23-26 長崎)

- 3) 廣田圭司、岩倉洋一郎、坂口志文:SKG マウス自己免疫性関節炎における IL-17 の役割 第16回 Kyoto T Cell Conference (2006. 6. 2-3.)
- 4) 杉本直志、種田貴徳、廣田圭司、中村恭子、野村尚史、内山卓、坂口志文:DNA マイクロアレー解析による Foxr3 依存性および非依存性の CD25⁺CD4⁺制御性 T 細胞特異的分子の同定 第 16 回 Kyoto T Cell Conference (2006. 6. 2-3.)
- 5) Kanji Nagahama : Transplantation Tolerance by Antigen-Specific Regulatory T Cells Expressing the Folate Receptor. World Transplant Congress(2006.7.22-27.Boston , USA)
- 6) Kanji Nagahama, Tomoyuki Yamaguchi, Keiji Hirota , Takashi Nomura , Shimon Sakaguchi. : Transplantation Tolerance by Antigen-Specific Regulatory T Cells Expressing the Folate Receptor. 第36回日本免疫学会総会 (2006. 12.11-13 大阪)
- 7) Tomoya Katakai, Takashi Nomura, Hiroyuki Gonda, Manabu Sugai, Shimon Sakaguchi, Akira Shimizu. : Spontaneous lymphoid neogenesis and balanced autoimmunity versus tolerance in the stomach of H+/K+-ATPase-reactive TCR transgenic mouse. 第 36 回日本免疫学会総会 (2006. 12.11-13 大阪)
- 8) Naoshi Sugimoto, Takatoku Oida, Keiji Hirota, Kyoko Nakamura, Takashi Nomura, Takashi Uchiyama , Shimon Sakaguchi. : Foxp3-dependent and -independent molecules specific for CD25⁺CD4⁺ natural regulatory T cells revealed by DNA microarray analysis. 第 36 回日本免疫学会総会 (2006. 12.11-13 大阪)
- 9) 山口 智之、坂口 志文. : CD4+CD25+Foxp3+制御性 T 細胞の誘導. 第 36 回日本免疫学会総会 (2006. 12.11-13 大阪)
- 10) Kajsia Wing, Haruhiko Yagi, Takashi Nomura, Shimon Sakaguchi. : The influence of GITR signaling on human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell mediated suppression. 第 36 回日本免疫学会総会 (2006. 12.11-13 大阪)
- 11) Hanna Igarashi, PIAO Jinhua, Yosuke Kamimura, Hideyuki IWAI, Masaaki Hashiguchi, Teruo Amagasa, Shimon Sakaguchi, Miyuki Azuma. : GITRL-mediated costimulatory function in CD25⁻ conventional and CD25⁺ regulatory CD4 T cells. 第 36 回日本免疫学会総会 (2006. 12.11-13 大阪)
- 12) Yosuke Kamimura, Hanna Igarashi, PIAO Jinhua, Hideyuki IWAI, Masaaki Hashiguchi, Shimon Sakaguchi, Miyuki Azuma. : Involvement of GITRL-mediated costimulatory function in contact hypersensitivity. 第 36 回日本免疫学会総会 (2006. 12.11-13 大阪)
- 13) Masahiro Ono, Hiroko Yaguchi, Naganari Ohkura, Issay Kitabayashi, Takashi Nomura, Yoshiki Miyachi, Toshihiko Tsukada, Shimon Sakaguchi. : A mechanism of IL-2 repression by Foxp3 and a Foxp3-interacting protein. 第 36 回日本免疫学会総会 (2006. 12.11-13 大阪)
- 14) Hiroko Yaguchi, Masahiro Ono, Naganari Ohkura , Shimon Sakaguchi, Toshihiko Tsukada. : Identification of an RNA binding protein involved in alternative splicing of CD45 pre-mRNA. 第 36 回日本免疫学会総会 (2006. 12.11-13 大阪)
- 15) Keiji Hirota , Motomu Hashimoto , Hiroyuki Yoshitomi, Satoshi Tanaka, Takashi Nomura, Yoichiro Iwakura, Noriko Sakaguchi, Shimon Sakaguchi. : Contribution of IL-6 to spontaneous differentiation into IL-17-producing arthritogenic T cells in SKG mice. 第 36 回日本免疫学会総会 (2006. 12.11-13 大阪)
- 16) 海江田 信二郎、水野 美歩、大木 伸司、坂口 志文、坂口 教子、山村 隆、三宅 幸子 : SKG マウスにおける結核死

菌投与による関節炎の誘導. 第36回日本免疫学会総会 (2006. 12.11-13 大阪)

H.知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金(免疫・アレルギー疾患予防・治療研究事業)
分担研究報告書

SLE に対する抗 CD20 抗体療法の開発に関する研究

分担研究者 田中 良哉 産業医科大学医学部第一内科学講座 教授
研究協力者 齋藤 和義 産業医科大学医学部第一内科学講座 助教授

研究要旨

全身性エリテマトーデス (SLE) は、多臓器障害を伴う代表的な自己免疫疾患であるが、急性期治療に関しては明確な指標はなく、ステロイド薬と免疫抑制薬の併用による非特異的治療が中心を成す。しかし、免疫抑制薬は保険未収載で、臨床試験を経た薬剤の開発が必至である。SLE は、B 細胞による過剰な自己抗体産生により齎される免疫複合体病であり、CD20 等の B 細胞特異的表面抗原は治療標的として重要である。リツキシマブを用いた CD20 抗体療法は、B 細胞リンパ腫を対象に保険収載されるが、申請者らは、既存の治療に抵抗性の重症 SLE 15 症例を対象に、B 細胞を標的とした CD20 モノクローナル抗体リツキシマブを用いたパイロットスタディを実践し、高い臨床効果を確認した。今回、当該班の構成員を中心に GCP 準拠第 I / II 相臨床試験を実践し、有効性、副作用、HACA 産生などの問題点の検証を行った。その結果、リツキシマブ 500 mg/kg x4 群、1000 mg/kg x2 群とも重篤な有害事象はなかった。24 週間経過観察期間中の有害事象は、3 例に感染症を併発したが、いずれも経口抗生剤の投与により改善した。注射時反応については、浮腫や倦怠感等が認められたが、一過性で軽微であった。末梢血 CD20 陽性 B 細胞数は全例に於いて、14 日以内に消失し、3~6 ヶ月間維持され、血清自己抗体値は減少傾向、血清補体価は上昇傾向にあったが、血清 IgG, IgA, IgM 値は不変であった。また、HACA は、7 例中 3 例で陽性 (リツキシマブの検出限界以下で) であったが、疾患活動性には影響がなかった。一方、有効性評価としては、14 例中 2 例が Major clinical response、7 例が Partial clinical response を示し、特に、中枢神経系と腎障害に於いて、改善傾向が顕著であった。以上から、中~重度の flare を有する SLE に対して抗 CD20 抗体リツキシマブ療法を用いた第 I / II 相臨床試験を実施し、安全性と有効性等が明らかになった。今後、そのメカニズムの解明と共に、SLE を対象としたリツキシマブの多施設間二重盲検比較試験を実施し、安全性と有効性を再確認し、新規治療法の確立を目指す。

A.研究目的

全身性エリテマトーデス (SLE) は、多臓器障害を伴う代表的な自己免疫疾患であるが、急性期治療に関しては明確な指標はなく、ステロイド薬と免疫抑制薬の併用による非特異的治療が中心を成す。しかし、免疫抑制薬は保険未収載で、臨床試験を経た薬剤の開発が必至である。SLE は、B 細胞による過剰な自己抗体産生により齎される免疫複合体病であり、CD20 等の B 細胞

特異的表面抗原は治療標的として重要である。

リツキシマブを用いた CD20 抗体療法は、B 細胞リンパ腫を対象に保険収載されるが、申請者らは、既存の治療に抵抗性の重症 SLE 15 症例を対象に、B 細胞を標的とした CD20 モノクローナル抗体リツキシマブを用いたパイロットスタディを実践し、高い臨床効果を確認した。今回、当該班の構成員を中心に GCP 準拠第 I / II 相臨床試験を実践し、有効性、副作用、HACA 産生など

の問題点の検証を行った。

B. 研究方法

リツキシマブ (IDEC-C2B8) の自己免疫疾患への適応拡大を目指すべく、SLE を対象とした臨床第 I / II 相試験 (新 GCP 準拠) を実施した (全薬工業主導)。対象は、ACR 規準にて SLE と診断し、ステロイド (PSL 換算 ≥ 0.4 mg/kg/day) による治療にもかかわらず、中～重度の flare (BILAG カテゴリー A 症状を 1 つ以上、或いは、カテゴリー B 症状を 2 つ以上) を有する症例とした。主要評価項目は安全性、副次的評価項目は有効性とした。悪性リンパ腫に用いる用法用量の安全性・忍容性について検討後 (5 例)、欧米に於ける SLE 対象の用法用量の安全性・認容性を検討した (10 例)。

(倫理面への配慮)

臨床検体を使用する場合には、所属機関の倫理委員会、或は、IRB で承認を得た研究に限定し、患者からインフォームドコンセントを得た上で、倫理委員会の規約を遵守し、所属機関の現有設備を用いて行う。患者の個人情報が入属機関外に漏洩せぬよう、試料や解析データは万全の安全システムをもって厳重に管理し、人権擁護に努めると共に、患者は、経済的負担を始め如何なる不利益や危険性も被らない事を明確にする。

C. 研究結果

(1) リツキシマブ 500 mg/kg x4 群、1000 mg/kg x2 群とも重篤な有害事象はなかった。24 週間経過観察期間中の有害事象は、3 例に感染症を併発したが、いずれも経口抗生剤の投与により改善した。注射時反応については、浮腫や倦怠感等が認められたが、一過性で軽微であった。(2) 全例において末梢血 CD20 陽性 B 細胞数は 14 日以内に消失し、3～6 ヶ月間維持された。(3) HACA は、7 例中 3 例で陽性 (リツキシマブの検出限界以下) であったが、疾患活動性には影響がなかった。(4) 生化学検査に有意な異常を認めず、また、血清自己抗体値は減少傾向、血

清補体価は上昇傾向にあったが、血清 IgG, IgA, IgM 値は不変であった。(5) 有効性評価としては、14 例中 2 例が Major clinical response (28 週目までに新たな flare を発症することなく、疾患活動性が BILAG カテゴリー C 以下まで低下)、7 例が Partial clinical response を示した。(6) 中枢神経系と腎障害に於いて、改善傾向が顕著であった。

D. 考察

第 I / II 相臨床試験に於いて、リツキシマブ療法の安全性と有効性が確認された。作用機序としては、B 細胞の除去による自己抗体産生、ひいては免疫複合体が関与する腎障害などを改善しえたものと考えられる。しかし、一部の症例で精神神経症状の極めて速やかな改善を認め、早期から脳動脈の壁不整や狭窄の改善、引いては血流の著明な回復を認めたことからリツキシマブがリンパ球による血管障害を制御した可能性もあるが、今後の更なる検討を要する。後者に於いては、さらに、リツキシマブにより SLE 患者末梢血の CD20、及び、CD40 や CD80 等の共刺激分子を高発現するメモリー B 細胞が優先的に投与数日以内に速やかに減少すること、CD19 陽性細胞上の CD40 と CD80 の発現量、さらに、CD40L や ICOS を発現する CD4 陽性 T 細胞が減少することを認めた。即ち、共刺激分子を発現するメモリー B 細胞を優先的に速やかに除去して、B-T 細胞間相互作用を制御し、自己免疫を制御した可能性が示唆される。今後、解決すべき疑問点も多いが、B 細胞標的療法の作用機序に更なる検討を加える計画である。

一方、米国 FDA から、リツキシマブを使用した SLE 患者のうち 2 名が進行性多発性白質脳症で死亡したと報告された。2 例とも免疫抑制薬との併用により免疫機能が著しく低下した症例で、末梢血 B 細胞が長期間枯渇することの危険性を示唆すると同時に、未承認の薬剤をオフラベルで使用することへの厳しい警告が付記された。また、本邦で使用された約 16,000 例の悪性リンパ腫患者に於いて、18 例に B 型肝炎のキャリア

からの再燃が報告され、9例が劇症肝炎となり、8例が死亡した。B型肝炎ウイルス、抗体、肝機能検査のモニタリングを十分に行い、本剤の適応を考慮する必要がある。

E. 結論

中～重度の flare を有する SLE に対して抗 CD20 抗体リツキシマブ療法を用いた第 I/II 相臨床試験を実施し、安全性と有効性が確認された。今後、そのメカニズムの解明と共に、SLE を対象としたリツキシマブの多施設間二重盲検比較試験を実施し、安全性と有効性を再確認し、新規治療法の確立を目指す。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tsujimura S, Saito K, Kohno K, Tanaka Y. Fragmented hyaluronan induces transcriptional up-regulation of the multidrug resistance-1 gene in CD4+ T cells. *J Biol Chem* (2006) 281, 38089-97
- 2) Tanaka Y. Anti-CD20 and other novel biotherapies for systemic lupus erythematosus. *APLAR J Rheumatol* (2006) 9, 413-418
- 3) Fujii Y, Fujii K, Tanaka Y. Attempt to correct abnormal signal transduction in T lymphocytes from systemic lupus erythematosus patients. *Autoimmunity Rev* (2006) 5, 143-144
- 4) Tanaka Y, Tokunaga M. Rituximab reduces both quantity and quality of B cells in SLE. *Rheumatology* (2006) 45: 122-123
- 5) Tsukamoto H, Nagafuji K, Horiuchi T, Miyamoto T, Aoki K, Takase K, Henzan H, Himeji D, Koyama T, Miyake K, Inoue Y, Nakashima H, Otsuka T, Tanaka Y, Nagasawa K, Harada M. A phase I-II trial of autologous peripheral blood stem cell transplantation in the treatment of refractory autoimmune disease. *Ann Rheum Dis* (2006) 65: 508-514
- 6) Fujii Y, Fujii K, Iwata S, Suzuki K, Azuma T, Saito K, Tanaka Y. Abnormal intracellular distribution of NFAT1 in T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus and characteristic clinical features. *Clin Immunol* (2006) 119: 297-306
- 7) Wang B, Tsukada J, Higashi T, Mizobe T, Matsuura A, Mouri F, Sawamukai N, Ra C, Tanaka Y. Growth suppression of human mast cells expressing constitutively active c-kit receptors by JNK inhibitor SP600125. *Genes Cells* (2006) 11, 983-992
- 8) Nakano K, Saito K, Mine S, Matsushida S, Tanaka Y. CD44 signaling up-regulates Fas Ligand expression on T cells leading to activation-induced cell death. *Apoptosis* (2007) 12, 45-54
- 9) Yamanaka H, Tanaka Y, Sekiguchi N, Inoue E, Saito K, Kameda H, Iikuni N, Nawata M, Amano K, Shinozaki M, Takeuchi T. Retrospective clinical study on the notable efficacy and related factors of infliximab therapy in a rheumatoid arthritis management group in Japan (RECONFIRM). *Mod Rheumatol* (2007) 17, 28-32
- 10) Tsujimura S, Saito K, Nakayamada S, Tanaka Y. Relevance of multidrug resistance 1 and P-glycoprotein to drug resistance in patients with systemic lupus erythematosus. *Histol Histopathol* (2007) 22, 465-468
- 11) Tokunaga M, Saito K, Kawabata D, Imura Y, Fujii T, Nakayamada S, Tsujimura S, Nawata M, Iwata S, Azuma T, Mimori T, Tanaka Y. Efficacy of rituximab (anti-CD20) for refractory systemic lupus erythematosus involving the central nervous system. *Ann Rheum Dis* (in press)
- 12) Nakano K, Okada Y, Saito K, Tanikawa R, Sawamukai N, Sasaguri Y, Kohro T, Wada Y, Kodama M, Tanaka Y. Rheumatoid synovial endothelial cells produce macrophage-colony stimulating factor leading to osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* (in press)
- 13) Nakayamada S, Saito K, Nakano K, Tanaka Y. $\beta 1$ integrin transduces an activation signal in T cells of patients with systemic lupus erythematosus.

Arthritis Rheum (in press)

14) Tanaka Y. B cell-targeting therapy using anti-CD20 antibody rituximab in inflammatory autoimmune diseases. Internal Medicine (in press)

2.学会発表

- 1) 田中良哉. 炎症性免疫疾患に対する抗 CD20 抗体療法. 第 103 回日本内科学会 (シンポジウム) 横浜. 平成 18 年 4 月 14-16 日
- 2) 田中良哉. MTX は関節リウマチ治療の基本です. 第 50 回日本リウマチ学会総会・学術集会 (ランチョン教育講演) 長崎. 平成 18 年 4 月 23-26 日
- 3) 田中良哉. B 細胞の CD20 をターゲットとしたリウマチ性疾患の治療戦略. 第 50 回日本リウマチ学会総会・学術集会 (シンポジウム) 長崎. 平成 18 年 4 月 23-26 日
- 4) 田中良哉, 山本一彦, 竹内勤, 西本憲弘, 宮坂信之, 住田孝之, 三森経世, 小池隆夫. 全身性エリテマトーデスを対象とした抗 CD20 モノクローナル抗体リツキシマブの臨床第 I/II 相試験 (中間報告). 第 50 回日本リウマチ学会総会・学術集会 (シンポジウム) 長崎. 平成 18 年 4 月 23-26 日
- 5) 田中良哉. 神経精神 SLE に対する抗 CD20 抗体リツキシマブの効果. 第 18 回日本アレルギー学会春季臨床大会 (シンポジウム) 東京. 平成 18 年 5 月 31 日~6 月 1 日
- 6) 田中良哉. オーバービュー ~免疫系と骨代謝系の普遍性~. 第 24 回骨代謝学会学術集会 (シンポジウム) 東京. 平成 18 年 7 月 6 日~7 月 8 日
- 7) 田中良哉. 全身性エリテマトーデス. 第 27 回日本炎症・再生学会 (シンポジウム) 東京. 平成 18 年 7 月 11 日~7 月 12 日
- 8) 田中良哉. 治療抵抗性 SLE の免疫抑制薬療法. 第 27 回日本炎症・再生学会 (シンポジウム) 東京. 平成 18 年 7 月 11 日~7 月 12 日
- 9) 田中良哉. 生物学的製剤による関節リウマチ治療のパラダイムシフト. 第 27 回日本炎症・再生学会 (ランチョン教育講演) 東京. 平成 18 年 7 月 11 日~7 月 12 日
- 10) 田中良哉. 自己免疫疾患に伴う全身の臓器障害とその克服. 第 34 回日本臨床免疫学会総会 (シンポジウム) 東京. 平成 18 年 10 月 1-2 日
- 11) 田中良哉. 関節リウマチに於ける寛解を目指した新しい治療戦略. 第 34 回日本臨床免疫学会総会 (シンポジウム) 東京. 平成 18 年 10 月 1-2 日
- 12) 田中良哉. 膠原病治療の新時代 ~生物学的製剤によるパラダイムシフト~. 第 16 回日本小児リウマチ学会総会 (特別講演) 松本. 平成 18 年 10 月 6-8 日
- 13) 田中良哉. 抗 CD20 抗体による全身性エリテマトーデスの治療の新展開. 第 56 回日本アレルギー学会秋季学術大会 (シンポジウム) 東京. 平成 18 年 11 月 2-4 日
- 14) 田中良哉. 炎症性サイトカインを標的とした関節破壊制御. 第 34 回日本リウマチ・関節外科学会 (シンポジウム) 新潟. 平成 18 年 11 月 10-11 日
- 15) 田中良哉. 関節リウマチ治療の新しいスタンダード. 第 34 回日本内科学会九州支部生涯教育講演会 (教育講演) 大分. 平成 18 年 11 月 19 日
- 16) 田中良哉. 生物学的製剤は中止可能か. 第 21 回日本臨床リウマチ学会 (シンポジウム) 東京. 平成 18 年 11 月 21-22 日
- 17) 田中良哉. 関節リウマチ治療のパラダイムシフト. 第 16 回日本リウマチ学会北海道・東北支部学術集会 (特別講演) 札幌. 平成 18 年 11 月 24-25 日
- 18) 田中良哉. CD20 抗体療法による炎症性免疫疾患の治療. 第 27 回日本臨床薬理学会年会 (シンポジウム) 東京. 平成 18 年 11 月 29 日-12 月 1 日
- 19) 田中良哉. 生物学的製剤の基礎から臨床へ. 第 6 回日本整形外科学会認定医研修会 (教育講演) 東京. 平成 18 年 12 月 3 日

H.知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む)

1.特許取得

1) Fas 抗原発現増強剤 (特許出願番号：特開
2003-171282)

2) Akt シグナル経路の活性化阻害を目的として
使用するレフルノミド (特願 2005-81972)

2.実用新案登録

なし

3.その他

なし